



19 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT

12 **Offenlegungsschrift**
10 **DE 199 30 253 A 1**

51 Int. Cl. 7:
B 01 D 57/02
C 07 K 1/26
G 01 N 27/447
G 01 N 27/26

21 Aktenzeichen: 199 30 253.7
22 Anmeldetag: 25. 6. 1999
43 Offenlegungstag: 28. 12. 2000

DE 199 30 253 A 1

71 Anmelder:
Wita GmbH Wittmann Institutes of Technology and
Analysis of Biomolecules, 14513 Teltow, DE
74 Vertreter:
Patentanwälte Gulde Hengelhaupt Ziebig, 10117
Berlin

72 Erfinder:
Wittmann-Liebold, Brigitte, Prof. Dr., 14195 Berlin,
DE; Scheler, Christian, 14167 Berlin, DE; Wurzel,
Christian, 12203 Berlin, DE; Reuter, Andreas, 10437
Berlin, DE

56 Entgegenhaltungen:
US 48 74 490
EP 06 84 467 A1
WO 98 59 092 A1

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

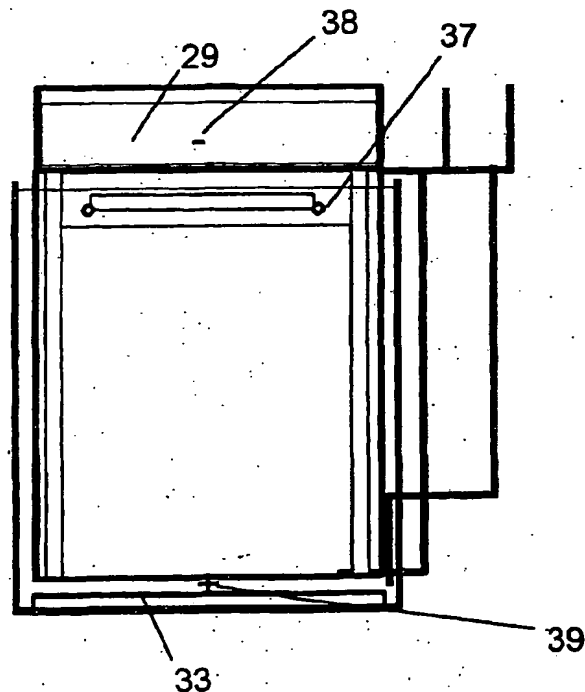
Prüfungsantrag gem: § 44 PatG ist gestellt

54 Kombinationskammer und Verfahren zur Trennung von Biomolekülen

57 Die Erfindung beschreibt eine Kombinationskammer und Verfahren zur Trennung von Biomolekülen oder anderen Stoffgemischen und ist anwendbar insbesondere bei der ein- oder zwei-dimensionalen Trennung von Biomolekülen in Gelen durch Elektrophorese in einer Elektrophoreseapparatur, beispielsweise der Auftrennung von Proteinen, Glycoproteinen, Lipoproteinen, Nukleinsäuren oder Zellkomplexen in Gelen.

Die Kombinationskammer zur zwei-dimensionalen Trennung von Biomolekülen oder anderen Stoffgemischen in waagrecht übereinander angeordneten Gelen durch Elektrophorese weist eine Rückwandplatte und eine Deckplatte auf, wobei zwischen Rückwandplatte und Deckplatte mindestens zwei Umlenkelemente zur Führung von Isolierelementen angeordnet sind.

Es wird weiterhin das Verfahren zur ein-dimensionalen sowie zwei-dimensionalen Trennung und die Rezeptur spezifischer Gele beschrieben.



DE 199 30 253 A 1

Beschreibung

Die Erfindung betrifft eine Kombinationskammer und Verfahren zur Trennung von Biomolekülen oder anderen Stoffgemischen und ist anwendbar insbesondere bei der ein- oder zwei-dimensionalen Trennung von Biomolekülen in Gelen durch Elektrophorese in einer Elektrophoreseapparatur, beispielsweise der Auftrennung von Proteinen, Glycoproteinen, Lipoproteinen, Nukleinsäuren oder Zellkomplexen in Gelen.

Aus der DE 198 31 210 ist ein Verfahren und eine Vorrichtung zur zwei-dimensionalen Trennung von Biomolekülen in Gelen durch Elektrophorese in einer Elektrophoreseapparatur bekannt, welche insbesondere der Auftrennung von beispielsweise Proteinen, Glycoproteinen, Lipoproteinen, Nukleinsäuren oder Zellkomplexen dienen. Die dort beschriebene Vorrichtung ist dadurch gekennzeichnet, daß eine Elektrophorese-Kombikammer einen Kern mit Kühlelementen aufweist, wobei die Kühlelemente unter den beidseitig des Kerns durch innere Platten und äußere Platten im Zusammenwirken mit entfernbaren oder schaltbaren Isolier-elementen gebildeten Gelkammern und Puffergefäßen angeordnet sind.

Das Verfahren basiert darauf, daß in der Elektrophorese-Kombikammer senkrecht nebeneinander angeordnete Gele bearbeitet werden.

Eine Behandlung von waagrecht übereinander angeordneten Gelen ist mit der beschriebenen Lösung nicht möglich.

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, eine Kombinationskammer und ein Verfahren zur Trennung von Biomolekülen zu schaffen, mit welchen mit einfachen Mitteln in einer einzigen Apparatur mit selbstgegossenen Gelen und/oder getrockneten Fertig Gelen effektive Gelelektrophoresen der ersten und zweiten Dimension vollautomatisch durchgeführt werden können. Es ist weiterhin Aufgabe der Erfindung, spezifische Fertiggele anzugeben.

Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß gelöst durch die Merkmale in den Ansprüchen 1, 10, 19 und 20.

Zweckmäßige Ausgestaltungen der Erfindung sind in den Unteransprüchen enthalten.

Ein besonderer Vorteil der Erfindung besteht darin, daß eine Vollautomatisierung der gesamten 2DE einfach durchgeführt werden kann, indem die Gele für die Trennung in der ersten Dimension und die Gele für die Trennung in der zweiten Dimension waagrecht zueinander, also übereinander angeordnet werden.

Diese waagerechte Anordnung wird dadurch ermöglicht, daß die Isolierelemente zwischen den Gelen der ersten Dimension und den Gelen der zweiten Dimension ebenfalls in einem definierten Bereich waagrecht verlaufen, gleichwohl jedoch über Umlenkelemente zur Führung nach oben hin aus der Kombinationskammer herausgezogen werden können.

Ein weiterer Vorteil der Erfindung besteht darin, daß mit der gleichen Kombinationskammer auch die ein-dimensionale Trennung durchgeführt werden kann, indem anstelle des Gels für die Trennung in der ersten Dimension sowie des Isolierelementes ein Kamm mit Probestaschen für verschiedene Proben in das SDS-Gel eingesetzt und dieses auspolymerisiert wird, der Kamm nach dem Auspolymerisieren entfernt, die Proben in die entstandenen Aussparungen eingebracht und nachfolgend die ein-dimensionale Elektrophorese durchgeführt wird.

Hierzu wird auf den Einsatz des Isolierelementes verzichtet und statt dessen ein Kamm mit Probestaschen beim Auspolymerisieren des SDS-Geles mit eingesetzt, der nach Auspolymerisierung des Geles herausgenommen wird, so daß nunmehr multiple Ports für das Auftragen verschiedener

Proben im Gel enthalten sind. Diese können alle parallel zueinander in der ein-dimensionalen Elektrophorese getrennt werden. Die Konstruktion der Kombinationskammer bleibt also erhalten und es können sowohl ein-dimensionale wie zwei-dimensionale Gele im gleichen Kammer-system durchgeführt werden. Vorteilhaft ist auch, daß lange Laufstrecken, z. B. 32 cm lange ein-dimensionale Gele, durchgeführt werden können.

Die Erfindung soll nachstehend anhand von in den Figuren dargestellten Ausführungsbeispielen näher erläutert werden. Es zeigen die Fig. 1 bis 5: eine Prinzipdarstellung der Kombinationskammer in den einzelnen Komplettierungsstufen.

Die Kombinationskammer besteht aus zwei Teilen, die übereinander angeordnet sind, dem oberen IEF-Teil für die Durchführung der IEF-Elektrophorese in der ersten Dimension und dem unteren Teil für die Durchführung der SDS-Elektrophorese in der zweiten Dimension.

Die Kombinationskammer besteht aus mehreren Bestandteilen, die beispielsweise durch Verschraubung oder Klemmen zusammengesetzt werden. Die Rückwandplatte 28A bildet mit dem oberen Pufferreservoir 29 der zweiten Dimension sowie den Gießgefäßen 30 zum Gießen der zweiten Dimension, dem Puffergefäß 31 zum Einfüllen des Puffers der zweiten Dimension eine Einheit. Die als Glasplatte ausgebildete Deckplatte 28B wird mit der Rückwandplatte 28A und dem oberen Pufferreservoir 29 z. B. durch Verschraubung verbunden. Flache Dichtungen 23 rechts und links dichten nach außen ab und legen die Dicke der Gele zwischen den Platten 28A und 28B fest. Die Platte 28B hat eine Höhe, die sich aus der Höhe der Platte 28A und der Höhe des oberen Pufferreservoirs 29 ergibt. Die Platten 28A, 28B können transparent sein. Insbesondere die obere Deckplatte 28B sollte durchsichtig sein, um die einzelnen Verfahrensschritte beobachten zu können.

Zwischen den Umlenkelementen 22 befindet sich U-förmig ein im vorliegenden Ausführungsbeispiel als Schlauchdichtung ausgebildetes Isolierelement 24, daß das Gel 25 der ersten Dimension vom Gel 36 der zweiten Dimension trennt. Neben den Umlenkelementen 22 befinden sich die Elektroden 26 und 27 für die Elektrophorese der ersten Dimension.

Die zusammengesetzte Konstruktion aus den Platten 28A, 28B und den oberen Reservoirs wird in den unteren Puffertank 32 der zweiten Dimension gestellt. Dort befindet sich eine Dichtung 33, die z. B. pneumatisch angehoben werden kann (Zustand 33a), um den Leerraum zwischen den Platten 28A und 28B nach unten abzudichten, damit das Gel 36 der zweiten Dimension über eine Verbindung (z. B. einen Schlauch) aus dem Gießgefäß 30 gegossen werden kann. Das Pufferfüllgefäß 31 dient dem Füllen des unteren Puffertanks 32. In dem Puffergefäß 29 und dem Puffertank 32 befinden sich die Elektroden 38 und 39 der zweiten Dimension.

Nachfolgend soll das Zusammensetzen der Kombinationskammer beschrieben werden.

Zur Vorbereitung der 2DE werden auf eine Glasplatte 28B, aus der zwei Umlenkelemente 22, z. B. Bolzen, herausragen, rechts und links jeweils Flachdichtungen 23 als Spacer aus Kunststoff gelegt (vgl. Fig. 1). Die Bereiche der ersten und zweiten Dimension sind lediglich durch ein Isolierelement 24, hier einen dehnbaren Kunststoffschlauch voneinander getrennt, der U-förmig zwischen den zwei Umlenkelementen 22 so angeordnet ist, daß sich eine gerade Abgrenzung nach unten ergibt. Er ragt an beiden Enden der oberen Kammer heraus und läßt sich leicht herausziehen. Zwischen den Umlenkelementen 22 wird im vorliegenden Ausführungsbeispiel ein IEF-Fertigelstreifen 25 positioniert.

niert (weiße waagerechte Fläche) und in direkten Kontakt mit den beiden Elektroden 26, 27 gebracht, die bei den Umlenkelementen 22 durch die Glasplatte 28B ragen und die Elektrophorese in der ersten Dimension ermöglichen. Dann wird die obere Glasplatte 28B aufgelegt (Fig. 2) und im vorliegenden Ausführungsbeispiel mittels Klammern mit der unteren Rückwandplatte 28A und dem oberen Pufferreservoir 29 zusammengehalten. Das Glasplattensandwich wird darauf in den Puffertank 32 gestellt (Fig. 3). Das Gießgefäß 30 dient zum Gießen des SDS-PAGE-Geles und das Reservoir 29 und der Puffertank 32 als Pufferreservoir für die SDS-PAGE, wobei der Puffertank 32 über eine Verbindungsleitung aus Pufferfüllgefäß 31 gefüllt wird.

Im Puffertank 32 befindet sich eine Dichtung 33, die beim Abdichten den Schlitz zwischen den beiden Glasscheiben 28A, 28B an der Unterseite verschließen kann. In Fig. 3 ist sie im nicht-abdichtenden Zustand dargestellt.

Die Vorbereitung und Durchführung der Elektrophorese verläuft im vorliegenden Ausführungsbeispiel wie folgt:

Das IEF-Gel 25 wird zur Rehydratisierung mit Rehydratisierungspuffer zwischen den Glasplatten 28A, 28B im Raum 34 überschichtet und rehydratisiert. Nach der Rehydratisierung (>2 h) wird der überschüssige Puffer entfernt. Dann wird die Probe in eine Aussparung 35 eingebracht, deren Platz durch Einbringung eines Spacer-Einsatzes während der Rehydratisierung ausgespart blieb. Dann wird die Elektrophorese durch Anlegen einer Spannung zwischen den Elektroden 26, 27 durchgeführt. Nach der Durchführung der IEF-Elektrophorese wird das IEF-Gel 25 durch Zusatz von Reequilibrationspuffer, der in Raum 34 eingebracht wird, umgepuffert (30 min. bei pH 6,9).

Das SDS-Gel 36 für die zweite Dimension wird vor, nach oder während der Durchführung der ersten Dimension gegossen, indem die Gellösung über das Gießgefäß 30 eingefüllt wird und durch eine Leitung nach unten zwischen die Glasplatten 28A, 28B geleitet wird (Fig. 4). In diesem Zustand dichtet die Dichtung 33A das Glasplatten-Sandwich nach unten ab, so daß die Gellösung nicht auslaufen kann. Das Gel 36 wird zwischen den Glasplatten 28A, 28B für mindestens zwei Stunden polymerisiert. Danach wird die Abdichtung durch die Dichtung 33A wieder aufgehoben und es resultiert die Dichtung 33.

Nach Beendigung der IEF-Elektrophorese und erfolgter Umpufferung des Gelstreifens 25 wird der Reequilibrationspuffer aus dem Raum 34 entfernt, der Kunststoffschlauch 24 aus der Apparatur seitlich nach oben z. B. mit einem Schrittmotor herausgezogen und der entstehende Zwischenraum 37 zwischen erster und zweiter Dimension mit Kontaktgel (z. B. Agarose-Sammelgel) befüllt (Fig. 5). Dann wird Puffer in das Pufferreservoir 29 und den Puffertank 32 eingefüllt und über ein elektrisches Feld zwischen den Elektroden 38, 39 der zweiten Dimension in den mit Puffer gefüllten Puffergefäßen 29, 32 die SDS-Elektrophorese in der zweiten Dimension durchgeführt. Nach Ende der Elektrophorese wird das Platten-Sandwich herausgenommen, das Gel abgehoben und nach bekannten Methoden entwickelt, z. B. mit Silbernitratlösung oder Coomassielösung angefärbt.

Die Kühlung beider Elektrophorese-Dimensionen erfolgt durch Eintauchen der Gelsandwiche in thermostatisierte Pufferlösung der zweiten Dimension, die sich in dem Puffertank 32 befindet, oder es werden die Kammersandwiche durch an die Glasplatten 28A, 28B angelegte Kühlkammern gekühlt.

Eine andere vorteilhafte Ausführung des Isolierelementes 24 besteht darin, daß es sich um einen Schlauch handelt, welcher zur Erhöhung der Abdichtungseigenschaften zwischen den beiden Gelen mittels eines Fluides aufgepumpt

werden kann und um die Entfernung des Schlauches nach der Durchführung der ersten Dimension zu erleichtern evakuiert werden kann. Eine weitere vorteilhafte Ausführung besteht darin, daß ein dünnwandiger Schlauch als Isolierelement verwendet wird. Der Schlauch kann in einer Rille in den Platten 28A und/oder 28B geführt sein und wird nach der Durchführung der ersten Dimension evakuiert und verbleibt aber in der Kombinationskammer. Der durch die Evakuierung freiwerdende Raum zwischen den beiden Gelen wird mit einem Kontaktgel befüllt. Der sonstige Ablauf der zwei-dimensionalen Elektrophorese verläuft analog dem beschriebenen.

Gegenstand der Erfindung sind auch neue IEF-Gele (isoelektrische Fokussierungsgele) gemäß der Ansprüche 20 bis 25, die einen hervorragenden Trenneffekt für Biomoleküle bieten, insbesondere für Proteine, und einen erweiterten Auftrennungsbereich auf der sauren und basischen Trennseite. Nachfolgend werden ausgewählte Rezepte von Gelen dokumentiert.

Standard-Rezepte

Ampholin-Fertiggele (hydratisiertes Gel)

3.5–4% Acrylamidgel mit 9 M Harnstoff mit minimal 2% Ampholinen (WITA Ampholyte), pH-Bereich pH 2.0 bis 11.0 (mit oder ohne Zusatz von Detergenzien und Thioharnstoff).

Ampholin-Immobilon-Fertiggele (hydratisiertes Gel)

3.5–4% Acrylamidgel mit 9 M Urea mit minimal 2% Ampholinen (WITA Ampholyte), pH-Bereich pH 2.0 bis 11.0 (mit oder ohne Zusatz von Detergenzien und Thioharnstoff)
seitliche Immobilinglele: 10% Acrylamidgel unter Zusatz von 50 mM bis 100 mM Immobilinen.

SDS-Gel, 2. Dimension

SDS-PAGE mit 15% Acrylamid, 0,1% SDS, Tris/HCl-Puffer, pH 8,8.

Rehydratisierungspuffer

9 M Harnstoff, 2–4% Ampholine, pH Bereich 2–11 (mit oder ohne Zusatz von Detergenzien und Thioharnstoff).

Reequilibrationspuffer

3% SDS, 70 mM DTT, Tris/Phosphat, pH 6,8.

Agarose Sammelgel

0,1% SDS, 1% Agarose, Tris/Phosphat, pH 6,8.

Elektrophorese-Puffer 1. Dimension

Puffer A: 4% (v/v) Phosphorsäure
Puffer B: 5% (v/v) Ethylendiamin.

Elektrophoresepuffer 2. Dimension

SDS-Laufpuffer: 192 mM Glycin, 25 mM Tris-Base, 0,1% SDS.

Laufbedingungen

1. Dimension

1 h	100 V
1 h	200 V
17,5 h	400 V
1 h	600 V
0,5 h	800 V
10 min	1500 V
5 min	2000 V

2. Dimension

30 min	40 mM
6 h	80 mM

Die Erfindung ist nicht beschränkt auf die hier dargestellten Ausführungsbeispiele. Vielmehr ist es möglich, durch Kombination und Modifikation der genannten Mittel und Merkmale weitere Ausführungsvarianten zu realisieren, ohne den Rahmen der Erfindung zu verlassen.

Bezugszeichenliste

22 Umlenkelement	25
23 Dichtung	
24 Isolierelemente	
25 Gel der ersten Dimension	
26 Elektrode der ersten Dimension	30
27 Elektrode der ersten Dimension	
28A Rückwandplatte	
28B Deckplatte	
29 oberes Pufferreservoir der zweiten Dimension	
30 Gießgefäß der zweiten Dimension	35
31 Pufferfüllgefäß der zweiten Dimension	
32 unterer Puffertank der zweiten Dimension	
33 Dichtung (kann z. B. pneumatisch angehoben werden)	
33A Dichtung (ist z. B. pneumatisch angehoben)	40
34 Raum zwischen Platten (28A, 28B) über der Schlauch (24), der zur Rehydratisierung und Umpufferung des Gels der ersten Dimension mit Puffer gefüllt wird	
35 Aussparung im Gel der ersten Dimension für Probenauftrag	45
36 Gel der zweiten Dimension	
37 Zwischenraum zwischen Platten (28A, 28B), der mit Kontaktgel gefüllt wird	
38 Elektrode im oberen Puffergefäß für Elektrophorese der zweiten Dimension	50
38 Elektrode im unteren Puffergefäß für Elektrophorese der zweiten Dimension	

Patentansprüche

1. Kombinationskammer zur zweidimensionalen Trennung von Biomolekülen oder anderen Stoffgemischen in waagrecht übereinander angeordneten Gelen durch Elektrophorese mit einer Rückwandplatte (28A) und einer Deckplatte (28B), wobei zwischen Rückwandplatte (28A) und Deckplatte (28B) mindestens zwei Umlenkelemente (22) zur Führung von Isolierelementen (24) angeordnet sind.
2. Kombinationskammer nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Kammeranordnung aus einem oberen IEF-Teil für die Durchführung der IEF-Elektrophorese in der ersten Dimension und einem unteren Teil für die Durchführung der SDS-Elektrophorese in

der zweiten Dimension besteht und die Gele (25) und (36) waagrecht übereinander angeordnet sind.

3. Kombinationskammer nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Platten (28A, 28B) nach außen durch Dichtungen (23) abgedichtet werden und die Gestaltung der Dichtungen (23) die Dicke der Gele (25, 36) festlegt.

4. Kombinationskammer nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß neben den Umlenkelementen (22) Elektroden (26, 27) für die Elektrophorese der ersten Dimension eingelassen sind.

5. Kombinationskammer nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Platte (28A) aus Keramik oder Glas besteht und die Platte (28B) eine transparente Platte ist.

6. Kombinationskammer nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Rückwandplatte (28A) mit dem oberen Pufferreservoir (29) der zweiten Dimension sowie dem Gießgefäß (30) und dem Pufferfüllgefäß (31) eine Einheit bildet.

7. Kombinationskammer nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die zusammengesetzte Konstruktion aus den Platten (28A, 28B) und dem oberen Pufferreservoir (29), dem Gießgefäß (30) und dem Pufferfüllgefäß (31) in den unteren Puffertank (32) gestellt angeordnet ist.

8. Kombinationskammer nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß eine Dichtung (33) angeordnet ist, welche anhebbar ausgebildet ist.

9. Kombinationskammer nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß in dem oberen Pufferreservoir (29) und in dem unteren Puffertank (32) Elektroden (38, 39) für die Elektrophorese der zweiten Dimension angeordnet sind.

10. Verfahren zur zwei-dimensionalen Trennung von Biomolekülen oder anderen Stoffgemischen in Gelen oder Polymerträgern durch Elektrophorese in einer Elektrophorese-Kombinationskammer, wobei

- ein IEF-Gel in der Kombinationskammer waagrecht angeordnet und zur Rehydratisierung mit Rehydratisierungspuffer überschichtet wird,
- nachfolgend eine Biomolekül- oder Stoffgemischprobe am IEF-Gel eingebracht oder am IEF-Gel angebracht und die Elektrophorese der ersten Dimension durchgeführt wird,
- vor, nach oder während der Durchführung der ersten Dimension ein SDS-Gel für die Durchführung der zweiten Dimension waagrecht zu dem IEF-Gel und von diesem isoliert in die Kombinationskammer eingebracht und das SDS-Gel polymerisiert wird,
- nach Beendigung der IEF-Elektrophorese die Isolierung aufgehoben, in die hierdurch entstehenden Räumen Kontaktgel eingeführt, Pufferlösung zugeführt und die SDS-Elektrophorese in der zweiten Dimension durchgeführt wird und anschließend die Gele nach bekannten Methoden entwickelt und angefärbt werden.

11. Verfahren nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß nach der Rehydratisierung des IEF-Gels überschüssige Pufferlösung entfernt wird.

12. Verfahren nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß die Aussparung im IEF-Gel durch Einbringen eines Spacer-Einsatzes während der Rehydratisierung erzeugt wird.

13. Verfahren nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß das IEF-Gel nach der Elektrophorese durch Zusatz von Reequilibrierungspuffer umgepuffert

wird.

14. Verfahren nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß die Isolierung durch Entfernen eines Kunststoffschlauches durch Herausziehen mittels eines Schrittmotors aufgehoben wird.

15. Verfahren nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß die Isolierung durch Evakuieren eines Kunststoffschlauches aufgehoben wird, wobei der Kunststoffschlauch wahlweise anschließend entfernt wird oder in der Kombinationskammer verbleibt.

16. Verfahren nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß die Kühlung beider Elektrophorese-Dimensionen durch Eintauchen der Gelsandwiche in thermostatisierte Pufferlösung der zweiten Dimension erfolgt.

17. Verfahren nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß die Kühlung beider Elektrophorese-Dimensionen durch in der Kombinationskammer angeordnete Kühlkammern realisiert wird.

18. Verfahren nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß die Biomolekül- oder Stoffgemischprobe in eine Aussparung im IEF-Gel eingebracht wird.

19. Verfahren zur eindimensionalen Trennung von Biomolekülen oder anderen Stoffgemischen durch Elektrophorese, dadurch gekennzeichnet, daß

anstelle des Gels für die Trennung in der ersten Dimension sowie des Isolierelementes ein Kamm mit Probenaschen für verschiedene Proben in das SDS-Gel eingesetzt und dieses auspolymerisiert wird,

– der Kamm nach dem Auspolymerisieren entfernt,

– die Proben in die entstandenen Aussparungen eingebracht und

– nachfolgend die ein-dimensionale Elektrophorese durchgeführt wird.

20. Hydratisiertes IEF-Gel hergestellt durch Gießen eines Immobilin-Gels mit niedrigem pK auf einer Gelpolymerisationsfolie und dessen Polymerisation, Gießen eines Acrylamidgels auf dem Immobilin-Gel und dessen Anpolymerisation, Gießen eines Immobilin-Gels mit hohem pK auf dem Acrylamidgel und dessen Anpolymerisation und nachfolgendes Rehydratisieren mittels eines Rehydratisierungspuffers, der 1–4% von solchen Ampholinen enthält, die einen pH-Bereich innerhalb von 2–11 ermöglichen.

21. IEF-Gel nach Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, daß die Immobilin-Gele aus 6–10%, vorzugsweise 10%, Acrylamid unter Zusatz von 50–200 mM, vorzugsweise 50–100 mM, Immobilin hergestellt sind.

22. IEF-Gel nach Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, daß das Acrylamidgel aus 3,5–4,5%, vorzugsweise 3,5–4%, Acrylamid hergestellt ist.

23. IEF-Gel nach Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, daß der Rehydratisierungspuffer von 5–9,5 M, vorzugsweise 9 M, Harnstoff und gegebenenfalls Detergenzien, vorzugsweise Tween 20, Chaps oder Triton X-100 enthält.

24. IEF-Gel nach Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, daß vor der Rehydratisierung gegebenenfalls Waschschriffe durchgeführt werden und getrocknet wird.

25. Trockengel hergestellt durch Gießen eines Immobilin-Gels mit niedrigem pK auf einer Gelpolymerisationsfolie und dessen Polymerisation, Gießen eines Acrylamidgels auf dem Immobilin-Gel und dessen Anpolymerisation, Gießen eines Immobilin-Gels mit hohem pK auf dem Acrylamidgel und dessen Anpolymerisation.

risation.

Hierzu 5 Seite(n) Zeichnungen

Fig. 1:

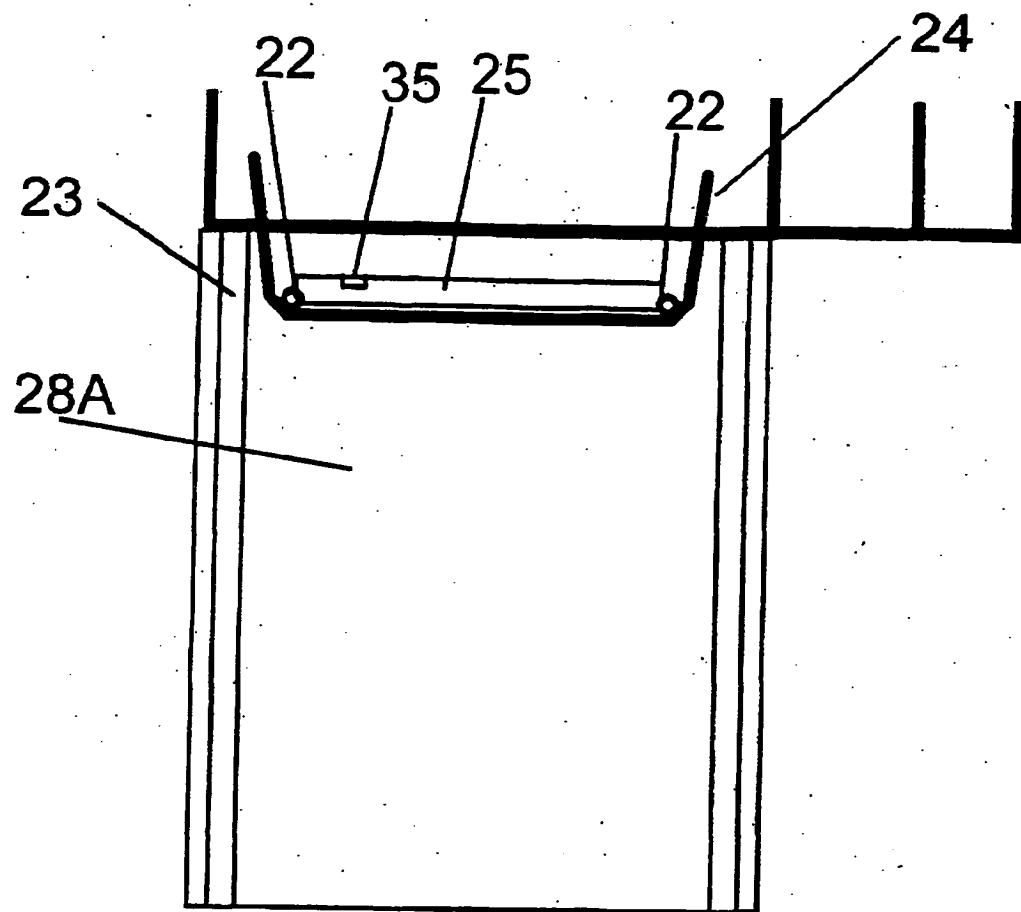


Fig. 2:

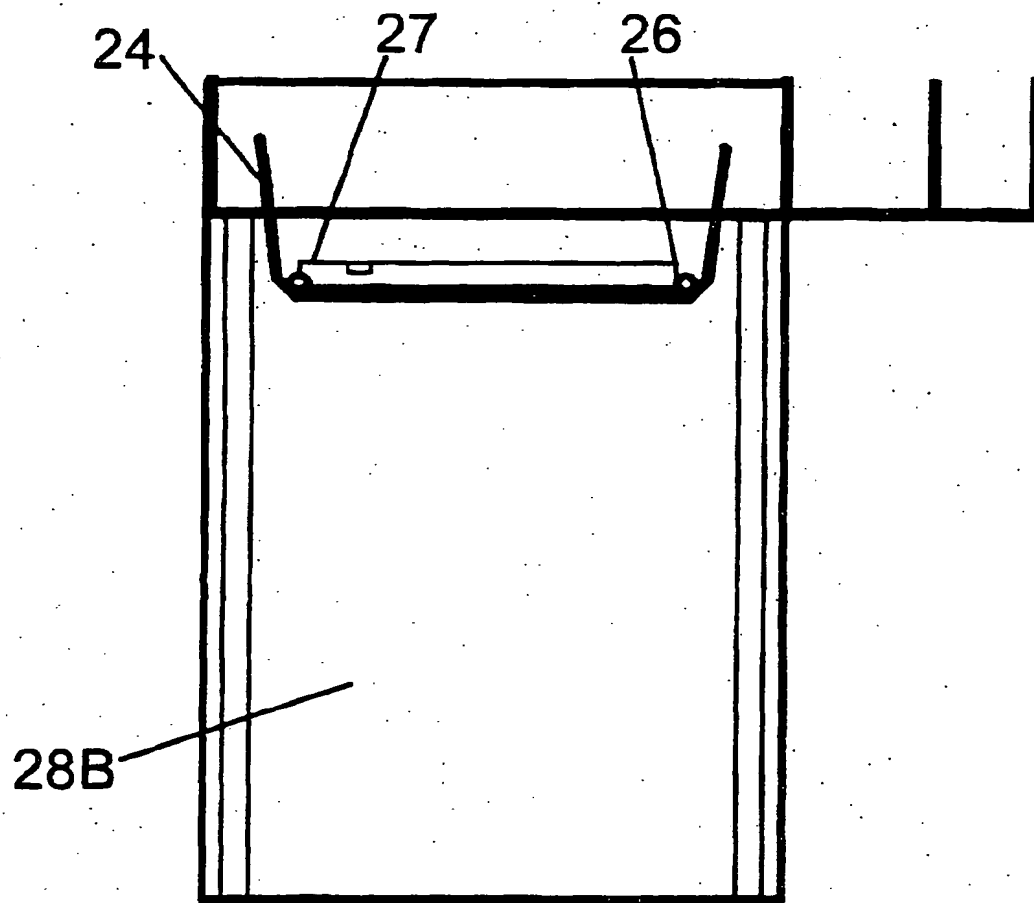


Fig. 3:

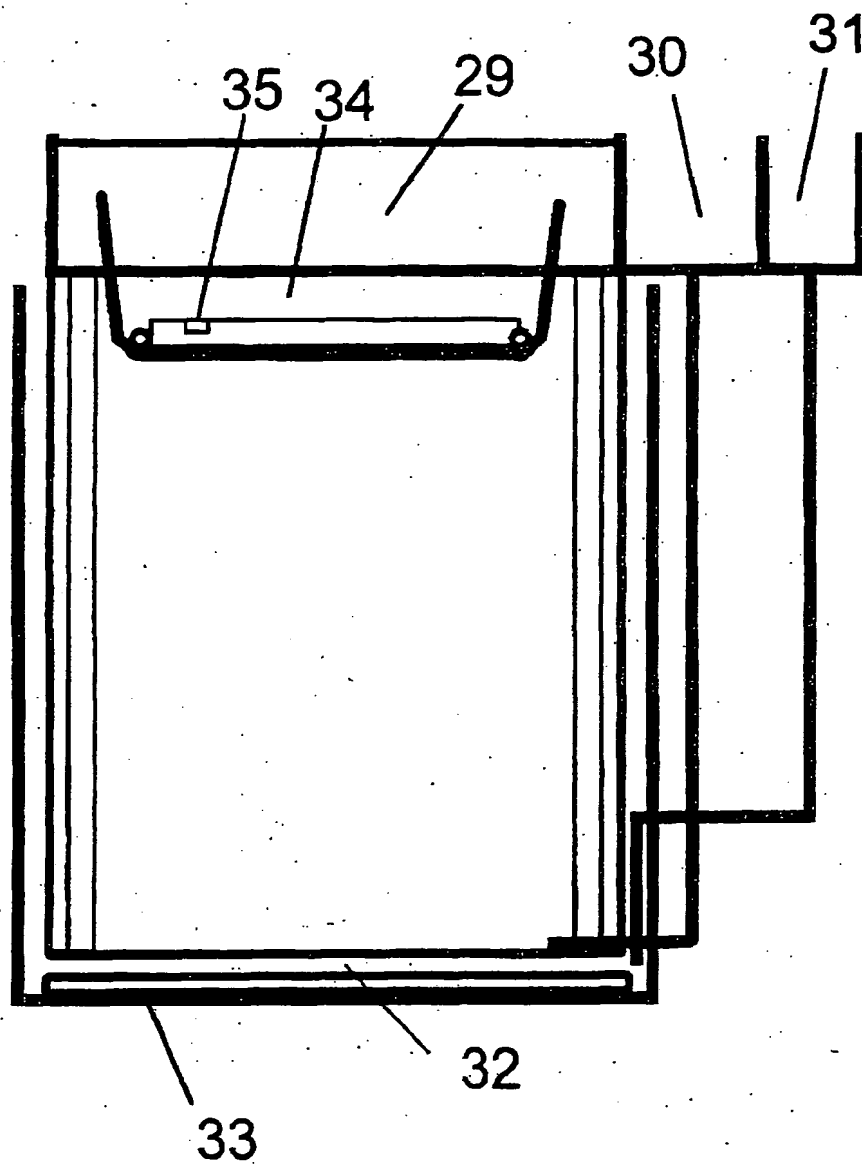


Fig. 4:

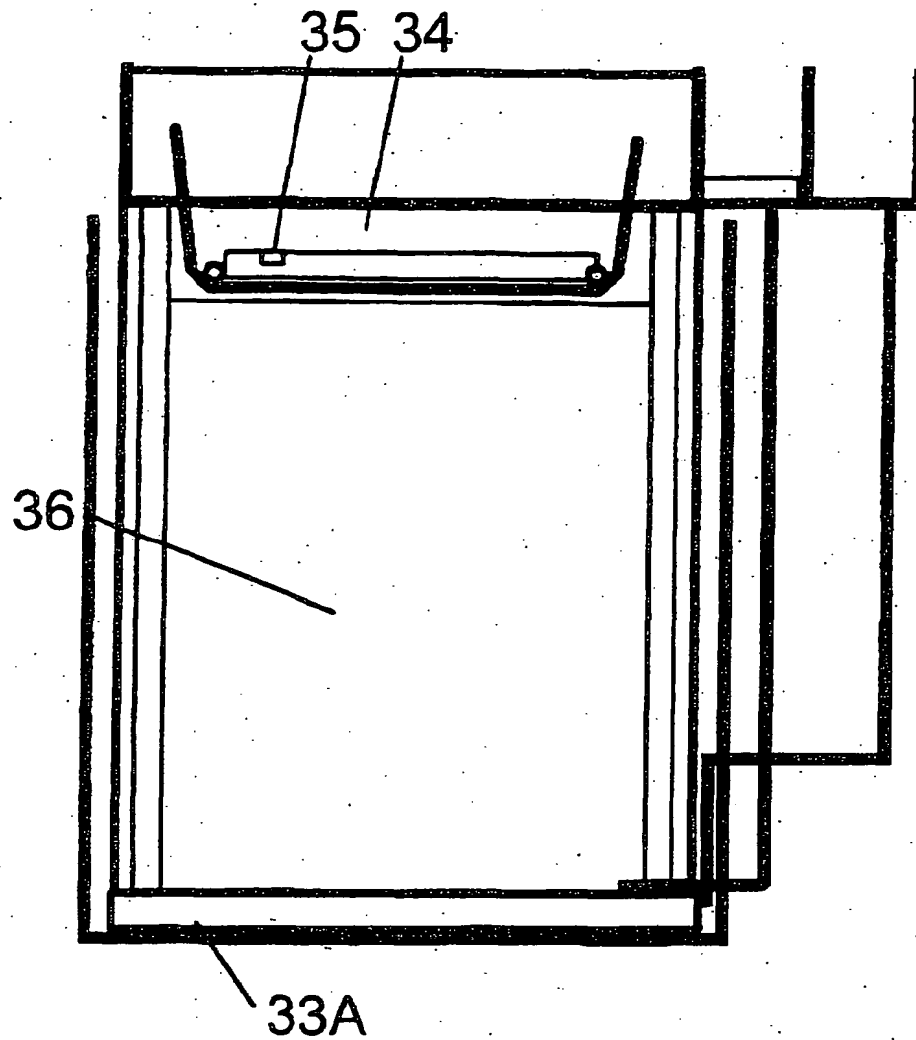


Fig. 5:

